

①⑫ **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

②① Anmeldenummer: **85111181.5**

⑤① Int. Cl.⁴: **G 01 N 33/547**
G 01 N 33/569

②② Anmeldetag: **04.09.85**

③⑩ Priorität: **28.09.84 DE 3435744**

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
02.04.86 Patentblatt 86/14

⑧④ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

⑦① Anmelder: **ORGANOGEN -**
Medizinisch-Molekularbiologische
Forschungsgesellschaft m.b.H.
Czerny-Ring 22
D-6900 Heidelberg(DE)

⑦② Erfinder: **Scheefers, Hans, Dr.**
Ludwigstrasse 46
Gross-Linden D-6300 Giessen(DE)

⑦④ Vertreter: **Weickmann, Heinrich, Dipl.-Ing. et al,**
Patentanwälte Dipl.-Ing. H.Weickmann Dipl.-Phys.Dr.
K.Fincke Dipl.-Ing. F.A.Weickmann Dipl.-Chem. B. Huber
Dr.-Ing. H. Liska Dipl.-Phys.Dr. J. Prechtel Postfach
860820
D-8000 München 86(DE)

⑤④ **Trägermaterial zur Verwendung für Immunbestimmungen.**

⑤⑦ Bei einem Trägermaterial für die Immunbestimmung ist ein Reaktionspartner der immunologischen Reaktion an das Trägermaterial über heterobifunktionelle photoaktivierbare Verbindungen, deren eine funktionelle Gruppe durch eine Arylacidgruppe gebildet wird, kovalent gebunden.

B e s c h r e i b u n g

Die Erfindung betrifft ein Trägermaterial zur Verwendung für die Immunbestimmung, bei dem ein Reaktionspartner der immunologischen Reaktion an das Trägermaterial kovalent gebunden ist sowie ein ein Verfahren zur Immunbestimmung.

Verfahren zur Immunbestimmung sind weitverbreitet. Häufig wird das ELISA-Verfahren angewendet, bei dem ein Reaktionspartner einer Immunreaktion an eine feste Phase adsorbiert vorliegt. Als feste Phase verwendet man in der Praxis dabei bevorzugt Kunststoffröhrchen oder Mikrotiterplatten, die an der Innenoberfläche adsorbiert den einen Partner der Reaktion tragen. Ebenso üblich ist es, Kugeln zu verwenden, die an ihrer Außenoberfläche adsorbiert den einen Partner der Reaktion tragen. Die gängigsten drei Verfahren zur Enzymimmunbestimmung sind nun das Sandwich-Verfahren, das indirekte Verfahren und das Kompetitionsverfahren. Bei dem Sandwich-Verfahren wird ein Antikörper an den Träger adsorbiert, die Testlösung wird zugegeben, wobei das in der Testlösung enthaltene spezifische Antigen an den Antikörper gebunden wird. Dann wird ein enzymmarkierter spezifischer Antikörper für den Antigen-Antikörper-Komplex zugegeben, der dann an den Komplex bindet. Zuletzt gibt man das für das Enzym spezifische Substrat zu. Dieses Substrat reagiert in spezifischer Weise. Die Reaktion kann beispielsweise photometrisch ausgewertet werden. Durch Messung der Lichtabsorption oder der optischen Dichte kann dann die Menge an Antigen berechnet werden, die der Absorption bzw. Dichte direkt proportional ist. Beim indirekten Verfahren wird ein Antigen an dem Trägermaterial adsorbiert. Man gibt Testlösung dazu, wobei der in der Testlösung enthaltene, für das adsorbierte Antigen spezifische Antikörper mit

dem Antigen reagiert. Bei Zugabe von enzymmarkiertem Antiglobulin bindet das Antiglobulin an den Antigen/-Antikörper-Komplex. Nach Zugabe eines für das Enzym spezifischen Substrates bildet sich wieder eine Farbe, die durch photometrische Messung ausgewertet werden kann und direkt proportional zur Menge des unbekannten Antikörpers in dem Testserum ist. Bei der dritten Methode, dem Wettbewerbsverfahren, wird einer der beiden Partner der Immunreaktion an das Trägermaterial adsorbiert. Man gibt dazu eine Lösung, die sowohl den unbekannten anderen Partner der Immunreaktion enthält, als auch eine bekannte Menge an enzymmarkiertem anderem Partner der Immunreaktion. Beide Partner binden nun in Konkurrenz mit dem am Träger adsorbierten Partner der Immunreaktion. Bei einer zweiten Probe gibt man eine Standardlösung dazu, die nur markierten Partner enthält. Beiden Lösungen gibt man dann das Enzymsubstrat zu und bestimmt durch photometrische Messung die Farbbildung. Die Differenz zwischen Standard und Probe läßt eine Berechnung der Menge an unbekanntem Reaktionspartner zu.

Häufig werden auch Radioimmunbestimmungen durchgeführt. Der RIA wird verwendet als Test zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Antigen oder Antikörper durch radioaktive Markierung eines der beiden Reaktionspartner. Er kann durchgeführt werden als Festphasentest, wobei einer der beiden Reaktionspartner an eine feste Phase gebunden ist, wodurch die Abtrennung der Antigen-Antikörper-Komplexe vom freien Partner wesentlich erleichtert wird. Der Test wird auf dem Prinzip der kompetitiven Hemmung durchgeführt. Dabei wird die

wird die Bindung eines radioaktiv markierten Antigens durch den spezifischen Antikörper durch ein nicht markiertes Antigen konzentrationsabhängig gehemmt. Je größer der Anteil des unmarkierten und zu messenden Antigens, desto geringer ist die Radioaktivität der Antigen-Antikörper-Komplexe. Bei dem Festphasen-RIA ist auch der direkte Bindungstest möglich.

Bei allen diesen Verfahren kann das Trägermaterial und der daran adsorbierte Partner der Immunreaktion nur einmal für den Test verwendet werden, danach wird beides gewöhnlich weggeworfen, da der gebundene Reaktionspartner der Immunreaktion adsorptiv an das Trägermaterial gebunden ist über starke und schwache Wechselwirkungen, sekundäre, nichtkovalente lipophile-, Dipol-Dipol- oder Ionen-Dipol-Interaktionen. Alle diese Bindungen halten den drastischen Bedingungen, die bei einer Regeneration zur Dissoziation der Antigen-Antikörper-Bindung führen, nicht stand. Ein gewisser Teil des am Trägermaterial gebundenen Partners der Immunreaktion löst sich bei dem Regenerierungsprozeß ab, so daß ein mehrmaliger Gebrauch der bisher bekannten Träger nicht möglich ist.

Aus An. Ref. Biochem. 35 (I) 1966, Seite 879, ist es bereits bekannt, Proteine über bifunktionelle Reagenzien an Trägermaterialien zu binden. Auch aus DE-OS 25 23 207 ist es bekannt, Biopolymere über Träger zu binden. Es ist jedoch nicht angegeben, wie eine derartige kovalente Bindung ausgeführt werden soll. Aus Angewandte Chemie, 84. Jahrgang, 1972, H. 8. Seiten 319-330 ist es bekannt, die kovalente Bindung über

funktionelle Gruppen, die an dem Trägermaterial vorliegen, durchzuführen. Dazu muß also der verwendete Träger über reaktive Gruppen verfügen, die den Reaktanten über den Brückenbildner kovalent binden können. Es war daher wünschenswert, eine Möglichkeit zu finden, so daß ein Protein oder der Partner einer immunologischen Reaktion kovalent an den Träger gebunden werden kann, ohne daß zuvor erst eine Derivatisierung durchgeführt werden müßte.

Es war deshalb sehr wünschenswert, wiederverwendbares Trägermaterial für Immunbestimmungen zu finden, bei dem ein Reaktionspartner so an das Trägermaterial gebunden ist, daß er bei der Regenerierungsreaktion nicht abgelöst wird.

Es war nun Aufgabe der Erfindung, ein Trägermaterial zu schaffen, das einen Partner einer Immunreaktion gebunden enthält und das mehrmals wiederverwendbar ist.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Trägermaterial zur Verwendung für die Immunbestimmungen, bei dem ein Reaktionspartner der immunologischen Reaktion an das Trägermaterial kovalent gebunden ist, das dadurch gekennzeichnet ist, daß der Reaktionspartner über heterobifunktionelle photoaktivierbare Verbindungen, deren eine Gruppe durch eine Arylacidgruppe gebildet wird, kovalent gebunden ist. Dazu werden bevorzugt die folgenden Verbindungen als Brückenbildner verwendet:

- N-5-Azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimid (ANB-NOS)
- p-Azidophenacyl Bromid
- p-Azidophenylglyoxal
- 4-Fluor-3-nitrophenyl-Azide
- Methyl-4-Azidobenzoimidate-HCl

- N-Succinimidyl-(4-Azidophenyldithio)-propionat
- N-(4-Azidophenylthio)phthalimid
- N-Hydroxysuccinimidyl-4-azido-benzoat
- N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylsäure
- N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenyl-amino)
Hexanoat
- Sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)-
hexanoat
- Ethyl-4-azidophenyl-1,4-dithiobutyrimidat-HCl
- N-Succinimidyl-(4-Azidophenyldithio)-propionat
- Sulfosuccinimidyl-(4-azidophenyldithio)-propionat
- 4,4'-Dithio-bis-phenylazide.

Besonders bevorzugt wird Lomant's Reagenz II: N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenyl-amino)-Hexanoat verwendet.

Ein so gebundener Reaktionspartner löst sich auch unter drastischen Bedingungen nicht von dem Trägermaterial, so daß ein derartig behandeltes Trägermaterial sehr oft wiederverwendbar ist.

Als Trägermaterial werden üblicherweise Kugeln, Mikrotiterplatten oder Röhrchen verwendet. Dieses Trägermaterial besteht aus einem Kunststoff, der die Eigenschaft besitzt, möglichst wenig Reaktionspartner adsorptiv zu binden. Außerdem muß er geeignet sein zur Bindung mit der als Brückenbildner verwendeten heterobifunktionellen Verbindung. Als besonders geeignet hat sich dabei ein oberflächenbehandeltes Polyethylen erwiesen, wie es beispielsweise unter der Bezeichnung "Minisorp-material" in Form von Röhrchen von der Firma NUNC, Dänemark, vertrieben wird. Es ist auch möglich, Kunststoffmaterial zu verwenden, das durch Derivatisierung zur Bindung mit der heterobifunktionellen Verbindung geeignet ist.

Das erfindungsgemäße Trägermaterial eignet sich für alle Arten von Immunbestimmungen, insbesondere für ELISA und Festphasen-RIA).

An das Trägermaterial gebunden werden können alle Reaktionspartner einer immunologischen Reaktion. So kann z. B. ein Antigen, ein Allergen oder ein Antikörper kovalent an den Träger fixiert werden.

Der Reaktionspartner wird über heterobifunktionelle photoaktivierbare Verbindungen, deren eine bifunktionelle Gruppe durch eine Arylazidgruppe gebildet wird, an das Trägermaterial gebunden. Bevorzugt werden als Brückenbildner die im Anspruch 2 aufgeführten Verbindungen verwendet. Besonders bevorzugt ist die als Lohmant's Reagenz II bekannte Verbindung N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)-Hexan, die auf der einen Seite eine Arylacidgruppe trägt, die sich in einer Photolysereaktion, ausgelöst durch sichtbares Licht, unter Bildung eines Nitrens umsetzen läßt. Das bei der Photolyse gebildete Nitren ist äußerst reaktiv. Es geht unselektiv bezüglich seines Reaktionspartners eine kovalente Bindung mit seinem nächsten Nachbarn ein. Dieses, durch Lichteinwirkung generierte Nitren, kann auch mit relativ inertem Material reagieren und ist bei der Reaktion nicht auf Reaktivgruppen eines bestimmten, aus besonderen Gründen anzuwendenden Materials angewiesen. Es reagiert sogar mit dem chemisch relativ inertem Polyethylen. Die andere funktionelle Gruppe des bevorzugten Brückenbildners ist ein N-Hydroxy-Succinimidester, der bei alkalischem pH sehr schonend mit nicht protonierten freien Aminogruppen eines Reaktanten, wie z. B. einem Protein, reagiert. Auf diese Weise ist es möglich, z. B. Antigene, Allergene und Antikörper zu binden.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung besteht darin, über den Brückenbildner zunächst Protein A (Agglutinin aus *Staphylococcus aureus* mit vier homologen Bindungsstellen für die Fc-Region von Immunglobulin G: Sjödahl, J. (1977) Eur. J. Biochem. 73 343-51) kovalent an das Trägermaterial zu binden. Zugefügte Antikörper können dann mit ihrem konstanten Teil an das kovalent mit Protein beschichtete Trägermaterial binden und die variablen Teile der Antikörper sind dann für die Bindung des anderen Partners der immunologischen Reaktion verfügbar. Eine so gerichtete Beladung des Trägers erhöht die biologische Effizienz der Beschichtung außerordentlich und macht das System, bezogen auf die verwendbare Trägerfläche, empfindlicher. Es besteht dann auch die Möglichkeit, den kovalent mit dem Protein A beschichteten Träger für eine weitere chemische Reaktion zu verwenden. Bei dieser chemischen Reaktion kann man unter Verwendung eines Proteinbrückenbildners den zuvor gerichtet adsorptiv an das Protein gebundenen Antikörper kovalent mit diesem vernetzen, so daß nach der Vernetzungsreaktion der Antikörper gerichtet und kovalent gebunden am Träger vorliegt.

Der über den Brückenbildner gebundene Reaktionspartner hat einen gewissen Abstand von dem Trägermaterial und auch eine gewisse Mobilität. Dies wirkt sich sehr günstig auf die Zugänglichkeit des kovalent gebundenen Reaktionspartners aus, was auch wiederum zu einer Verbesserung der Immunreaktion führt.

Das erfindungsgemäße Trägermaterial, das den einen Partner einer Immunreaktion kovalent gebunden über einen Brückenbildner trägt, kann häufig wiederverwendet

werden, da sich der Reaktionspartner auch unter den drastischen Bedingungen, die für die Regenerierung erforderlich sind, nicht von dem Trägermaterial ablöst, da er ja kovalent und nicht adsorptiv gebunden vorliegt.

Das erfindungsgemäße Verfahren für die Immunbestimmung, bei dem einer der an der Immunreaktion beteiligten Partner kovalent an ein Trägermaterial gebunden wird, ist dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung über eine heterobifunktionelle, photoaktivierbare Verbindung, deren eine Gruppe durch eine Arylacidgruppe gebildet wird, vorzugsweise über N-Succinimidyl-6(4'-azido-2'-nitrophenyl-amino)-Hexan, als Brückenbildner erfolgt, die Immunbestimmung durchgeführt wird und das Trägermaterial mit dem daran gebundenen Partner nach der Immunreaktion wiedergewonnen wird.

Dieses Verfahren kann mit dem erfindungsgemäßen Trägermaterial beliebig oft wiederholt werden, da sich der kovalent gebundene Partner auch unter den drastischen Reaktionsbedingungen der Regenerierung nicht ablöst und gebunden bleibt.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird an den Träger Protein A kovalent gebunden, das dann einen Antikörper trägt. Auf diese Weise werden die konstanten Teile des Antikörpers gebunden und die variablen Teile des Antikörpers stehen für die immunologische Reaktion zur Verfügung. Nach Durchführung der immunologischen Reaktion kann dann der Träger mit dem kovalent gebundenen Protein A und dem daran adsorptiv oder kovalent gebundenen Antikörper wiedergewonnen werden durch Regenerierung.

Das erfindungsgemäße Trägermaterial und das Verfahren zur Immunbestimmung haben mehrere Vorteile. Ein und dasselbe Trägermaterial läßt sich sehr oft nach jeweils geeigneten Regenerierungsschritten für Immunbestimmungen verwenden. Besonders vorteilhaft ist das erfindungsgemäße wiederverwendbare Trägermaterial für Immunbestimmungen, in denen als zu bindender Reaktionspartner ein Partner verwendet wird, der nur in begrenzter Menge vorhanden ist, da er sich schwierig herstellen läßt oder schwierig zu isolieren oder synthetisieren ist. In diesen Fällen läßt sich die zur Verfügung stehende Menge an Reaktionspartner an derivatisiertes Trägermaterial koppeln und es ist auf diese Weise möglich, wesentlich mehr Immunbestimmungen mit einer begrenzt vorliegenden Menge an Reaktionspartner auszuführen. Weiterhin werden die Kosten für die einzelne Bestimmung erheblich gesenkt.

B e i s p i e l

Es wurde Protein A mit der als Brückenbildner verwendeten Verbindung N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenyl-amino)-Hexan an ein Trägermaterial gebunden. Nach entsprechenden Waschschritten wurde das trägergebundene Protein A ohne Lichteinwirkung mit dem Lohmant's Reagenz bei alkalischem pH-Wert reagieren gelassen. Dieser zweite Brückenbildner reagierte unter diesen Bedingungen mit dem N-Hydroxy-Succinimidester als funktionelle Gruppe kovalent mit dem Träger gebundenen Protein A. Nach weiteren Waschschritten wurde das derivatisierte trägergebundene Protein A mit Antikörpern inkubiert, welche hierbei mit ihrem konstanten Teil an das Protein

A gebunden wurden. Nach erneuten weiteren Waschschr-
ten konnte man durch eine photochemische Reaktion Anti-
körper, gerichtet an das Protein A, kovalent binden,
wobei der variable Teil des Antikörpers jeweils der
Trägeroberfläche abgewandt und dem zu bindenden Antigen
zugewandt war. Der so derivatisierte Träger hatte eine
höhere Beladungsdichte und eine daraus resultierende
höhere enzymatische Aktivität pro Fläche. Er konnte für
100 Bestimmungen verwendet werden.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Trägermaterial zur Verwendung für die Immunbestimmung, bei dem ein Reaktionspartner der immunologischen Reaktion an das Trägermaterial kovalent gebunden ist, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß der Reak-
tionspartner über heterobifunktionelle photoakti-
vierbare Verbindungen, deren eine Gruppe durch
eine Arylacidgruppe gebildet wird, kovalent
gebunden ist.

2. Trägermaterial nach Anspruch 1,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß als heterobifunktionelle photoaktivierbare
Verbindung
 - N-5- Azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimid (ANB-NOS)
 - p-Azidophenacyl Bromid
 - p-Azidophenylglyoxal
 - 4-Fluoro-3-nitrophenyl Azide
 - Methyl-4-Azidobenzoimidat-HCl
 - N-Succinimidyl-(4-Azidophenyldithio)-propionat
 - N-(4-Azidophenylthio)phthalimide
 - N-Hydroxysuccinimidyl-4-azido-benzoat
 - N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylsäure
 - Sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)
hexanoat
 - Ethyl-4-azidophenyl-1,4-dithiobutyrimidat-HCl
 - N-Succinimidyl-(4-Azidophenyldithio)-propionat
 - Sulfosuccinimidyl-(4-azidophenyldithio)-propionat
und/oder
 - 4,4'-Dithio-bis-phenylazide verwendet werden.

3. Trägermaterial nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die heterobifunktionelle photoaktivierbare Verbindung N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenyl-amino)-Hexanoat ist.
4. Trägermaterial nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß an den Brückenbildner ein Protein gebunden ist, das einen Reaktionspartner der immunologischen Reaktion trägt.
5. Verfahren zur Immunbestimmung, bei dem einer der an der Immunreaktion beteiligten Partner kovalent an ein Trägermaterial gebunden wird, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß die Bindung über eine heterobifunktionelle, photoaktivierbare Verbindung, deren eine Gruppe durch eine Arylacidgruppe gebildet wird, vorzugsweise über N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenyl-amino)-Hexan, als Brückenbildner erfolgt, die Immunbestimmung durchgeführt wird und das Trägermaterial mit dem daran gebundenen Partner nach der Immunreaktion wiedergewonnen wird.
6. Verfahren zur Immunbestimmung, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß man photoaktivierbare Brückenbildner kovalent an Protein A (Agglutinogen aus Staphylococcus aureus) bindet (gerichtete Bindung von Antikörpern an einen Träger) und dann einen Reaktionspartner einer Immunreaktion mit dem konstanten Teil an das Protein bindet, die Immunbestimmung durchführt und das Trägermaterial mit dem daran gebundenen Protein wiedergewinnt.

7. Verfahren nach Anspruch 6, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß man den an
das Protein A (Agglutinogen aus Staphylococcus
aureus) gebundenen Reaktionspartner kovalent mit
diesem vernetzt unter Verwendung heterobifunktio-
neller Brückenbildner.

8. Verfahren nach Anspruch 7, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t , daß der Brücken-
bildner N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylsäure
oder N-Succinimidyl-6-(4-azido-2-nitrophenyl-
amino)-hexan ist.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0175973

Nummer der Anmeldung

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 85111181.5														
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)														
A	US - A - 4 046 723 (DORMAN) * Ansprüche 1,6 *	1,2	G 01 N 33/547 G 01 N 33/569														

D,A	EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Band 73, 1977 J.SJÖDAHL "Repetitive Sequences in Protein A from Staphylococcus aureus 2" Seiten 343-351 * Zusammenfassung *	1,6,7															

			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)														
			G 01 N 33/00														
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt																	
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	Prüfer														
WIEN		25-11-1985	SCHNASS														
<table border="0"><tr><td>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN.</td><td>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</td></tr><tr><td>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet</td><td>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument</td></tr><tr><td>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</td><td>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument</td></tr><tr><td>A : technologischer Hintergrund</td><td></td></tr><tr><td>O : mündliche Offenbarung</td><td></td></tr><tr><td>P : Zwischenliteratur</td><td>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</td></tr><tr><td>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</td><td></td></tr></table>				KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN.	E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	D : in der Anmeldung angeführtes Dokument	Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	L : aus andern Gründen angeführtes Dokument	A : technologischer Hintergrund		O : mündliche Offenbarung		P : Zwischenliteratur	& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN.	E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist																
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	D : in der Anmeldung angeführtes Dokument																
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	L : aus andern Gründen angeführtes Dokument																
A : technologischer Hintergrund																	
O : mündliche Offenbarung																	
P : Zwischenliteratur	& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument																
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze																	

EP 85111181.5